

Перспективы совместного применения *Pseudomonas koreensis* и *Pseudomonas plecoglossicida* для биологического обогащения растений азотом

¹ Кемеровский государственный университет, г. Кемерово, Российская Федерация

² Лаборатория селекции и агротехники полевых культур Кемеровский НИИСХ – филиал Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН, пос. Новостройка, г. Кемерово, Российская Федерация

Ю. Р. Серазетдинова¹, Н. Н. Богачёва¹, К. В. Карчин¹,
О. А. Исачкова², О. А. Неверова¹, Л. К. Асякина¹

КОРРЕСПОНДЕНЦИЯ:

Н. Н. Богачёва

E-mail: nataliakhoroshkina@mail.ru

ДЛЯ ЦИТИРОВАНИЯ:

Серазетдинова, Ю.Р., Богачёва, Н.Н., Карчин, К.В., Исачкова, О.А., Неверова, О.А., & Асякина, Л.К. (2025). Перспективы совместного применения *Pseudomonas koreensis* и *Pseudomonas plecoglossicida* для биологического обогащения растений азотом. *Хранение и переработка сельхозсырья*, 33(1), 116-129. <https://doi.org/10.36107/spfr.2025.1.573>

ПОСТУПИЛА: 13.10.2024

ДОРАБОТАНА: 03.03.2025

ПРИНЯТА: 15.03.2025

ОПУБЛИКОВАНА: 31.03.2025

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ:

авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена в рамках государственного задания по теме «Исследование потенциала ростостимулирующих бактерий для повышения агрономической биофортификации пшеницы» (шифр FZSR-2024-0009).



АННОТАЦИЯ

Введение: Значительные экономические затраты и возможные экологические риски, связанные с неправильным применением минеральных удобрений, обуславливают необходимость разработки альтернативных стратегий азотного питания сельскохозяйственных культур. Одним из таких подходов является биологическая фиксация азота азотфиксирующими микроорганизмами. Процесс биологической фиксации наиболее изучен в контексте симбиотических взаимодействий с бобовыми культурами, однако современные исследования сосредоточены на расширении его применения для небобовых растений. В этом контексте значительный интерес представляют несимбиотические диазототрофы рода *Pseudomonas*, азотфиксирующий потенциал которых требует дальнейшего изучения и верификации. Настоящее исследование характеризует функциональный потенциал отечественных штаммов *Pseudomonas* и формирует научную основу для их эффективного совместного применения с целью улучшения азотного питания небобовых культур.

Цель: Охарактеризовать азотфиксирующую способность *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802, а также изучить перспективы совместного применения штаммов в улучшении азотного питания растений.

Материалы и методы: объектами исследования являлись штаммы *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802, полученные из Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт». Способность штаммов фиксировать атмосферный азот исследовали с помощью анализатора азота Rapid N. Способность штаммов продуцировать аммиак оценивали спектрофотометрическим методом. Лабораторную апробацию проводили на яровой мягкой пшенице (*Triticum aestivum* L. emend.) «Сибирский Альянс». Количество азота и белка в надземной части растений в фазе проростка по шкале десятичного кода определяли по методу Дюма.

Результаты: Изученные штаммы фиксировали азот при выращивании на безазотной питательной среде, а также обладали способностью к продуцированию аммиака. Настоящее исследование является первым заявлением об азотфиксирующей способности *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802. Штаммы не ингибировали рост друг друга, что позволило сконструировать консорциумы на их основе. Оптимальное соотношение 2:1 (*P. koreensis*: *P. plecoglossicida*) интенсифицировало азотфиксацию (289,76 мкг/мл) и продуцирование аммиака (344,20 мкг/мл). Лабораторная апробация показала статистически достоверное увеличение всхожести, длин надземной и корневой части *Triticum aestivum* L. emend. при обработке консорциумом в сравнении с контрольным вариантом на 17 %, (2,4 и 1,7 см, соответственно). Также надземная часть *Triticum aestivum* L. emend., обработанная консорциумом, содержала на 0,51 % больше азота и на 1,15 % больше белка, чем контрольный вариант.

Выводы: Перспективным является применение консорциума, состоящего из *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 в соотношении 2 к 1, в качестве биоудобрения для повышения азотного питания и урожайности пшеницы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

биологическая фиксация азота; пшеница; микробный консорциум; *Pseudomonas*; ризобактерии

Prospects for the combined use of *Pseudomonas koreensis* and *Pseudomonas plecoglossicida* for biological enrichment of plants with nitrogen

¹ Kemerovo State University», Kemerovo, Russian Federation

² Kemerovo Research Institute of Agricultural Sciences – branch of the Siberian Federal Scientific Center for Agrobiotechnology of the Russian Academy of Sciences, village New building, Kemerovo, Russian Federation

Yuliya R. Serazetdinova¹, Natalia N. Bogacheva¹,
Konstantin V. Karchin¹, Olga A. Isachkova², Olga Al. Neverova¹,
Lyudmila K. Asyakina¹

CORRESPONDENCE:

Natalia N. Bogacheva

E-mail: nataliakhoroshkina@mail.ru

FOR CITATIONS:

Serazetdinova, Yu.R., Bogacheva, N.N., Karchin, K.V., Isachkova, O.A., Neverova, O.A., & Asyakina, L.K. (2025). Prospects for the combined use of *Pseudomonas koreensis* and *Pseudomonas plecoglossicida* for biological enrichment of plants with nitrogen. *Storage and Processing of Farm Products*, 33(1), 116-129. <https://doi.org/10.36107/spfp.2025.1.573>

RECEIVED: 13.10.2024

REVISED: 03.03.2025

ACCEPTED: 15.03.2025

PUBLISHED: 31.03.2025

DECLARATION OF COMPETING

INTEREST: none declared.

FUNDING

The work was funded by the state task «Research of the potential of growth-stimulating bacteria to increase the agronomic biofortification of wheat» (code FZSR-2024-0009)



ABSTRACT

Introduction: Significant economic costs and potential environmental risks associated with improper use of mineral fertilizers necessitate the development of alternative strategies for nitrogen nutrition of agricultural crops. One of such approaches is biological nitrogen fixation by nitrogen-fixing microorganisms. The process of biological fixation has been studied best in the context of symbiotic interactions with legumes, but modern research is focused on expanding its application to non-legumes. In this context, non-symbiotic diazotrophs of the genus *Pseudomonas* are of considerable interest; their nitrogen-fixing potential requires further study and verification. This study characterizes the functional potential of domestic *Pseudomonas* strains and forms a scientific basis for their effective combined use to improve nitrogen nutrition of non-legumes.

Purpose: To characterize the nitrogen-fixing capacity of *Pseudomonas koreensis* B-3481 and *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 and to investigate the prospects of their combined application for enhancing plant nitrogen nutrition.

Materials and Methods: The study analysed the strains *Pseudomonas koreensis* B-3481 and *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 obtained from the National Bioresource Center of the All-Russian Collection of Industrial Microorganisms of the National Research Center «Kurchatov Institute». The nitrogen-fixing activity of the strains was studied using a Rapid N analyzer, and the ability to produce ammonia was evaluated spectrophotometrically. Laboratory testing was carried out on «Siberian Alliance» spring soft wheat (*Triticum aestivum* L. emend.). The amount of nitrogen and protein in the aboveground part of plants in the sprout phase on a decimal code scale was determined using the Dumas method.

Results: Research has shown that the studied strains fixed nitrogen when grown on a nitrogen-free nutrient medium, and also had the ability to produce ammonia. The present study is the first to report the nitrogen-fixing ability of *Pseudomonas koreensis* B-3481 and *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802. The strains did not inhibit each other's growth, which made it possible to construct consortia based on them. The optimal ratio of 2:1 (*P. koreensis*: *P. plecoglossicida*) intensified nitrogen fixation (289.76 µg/mL) and ammonia production (344.20 µg/mL). Laboratory testing showed a statistically significant increase in germination, the length of the aerial and root parts of *Triticum aestivum* L. emend. when treated with a consortium in comparison with the control option by 17% (2.4 and 1.7 cm, respectively). Also, the aerial part of *Triticum aestivum* L. emend., treated by the consortium, contained 0.51% more nitrogen and 1.15% more protein than the control variant.

Conclusion: It is promising to use a consortium consisting of *Pseudomonas koreensis* B-3481 and *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 in a ratio of 2 to 1 as a biofertilizer to increase nitrogen nutrition and wheat yield.

KEYWORDS

biological nitrogen fixation; wheat; microbial consortium; *Pseudomonas*; rhizobacteria

ВВЕДЕНИЕ

Азот является одним из ключевых макроэлементов, необходимых для роста и развития растений, поскольку входит в состав аминокислот, белков, нуклеиновых кислот, хлорофилла и множества других первичных и вторичных метаболитов (Fageria & Baligar, 2005; Rafiq et al., 2023). Несмотря на высокую концентрацию молекулярного азота в атмосфере (около 78 %), в свободной форме он недоступен для растений и может быть усвоен только после трансформации в минеральные соединения: нитраты, нитриты или ионы аммония (Temple et al., 1998). Основными источниками азота в агроценозах традиционно являются минеральные удобрения, содержащие соединения аммония и нитратов (Трапезников и др., 1999; Ahmed et al., 2020). Однако применение этих удобрений сопровождается рядом неблагоприятных экологических последствий, включая закисление почв, эмиссию парниковых газов и нарушение микробиоценоза (Khan et al., 2018). Эти эффекты обусловлены микробиологически опосредованными трансформациями азотных соединений в почвенной среде и требуют переосмысления существующих стратегий азотного питания сельскохозяйственных культур.

Актуальность разработки альтернативных, экологически безопасных подходов к обеспечению растений азотом возрастает на фоне необходимости устойчивого интенсифицирования растениеводства. Одним из наиболее перспективных направлений в этом контексте является использование азотфиксирующих микроорганизмов, ассоциированных с ризосферой растений. Эти микроорганизмы способны превращать молекулярный азот атмосферы в доступные для растений формы в процессе биологической фиксации азота, снижая потребность в минеральных удобрениях (Тихонович и соавт., 2016; Singh et al., 2022). Наиболее изучены симбиотические взаимодействия бобовых культур с клубеньковыми бактериями (Kishorekumar et al., 2020), однако возрастающий научный интерес вызывает группа несимбиотических (ассоциативных) азотфиксирующих бактерий, способных колонизировать ризосферу широкого круга растений без формирования специализированных симбиотических структур.

Среди таких микроорганизмов особое внимание уделяется представителям рода *Pseudomonas*, обладающим высоким метаболическим и эколо-

гическим разнообразием. Способность к фиксации атмосферного азота у отдельных штаммов *Pseudomonas* была впервые выявлена в середине XX века (Anderson, 1955), а последующие исследования подтвердили наличие у них *nif*-генов, кодирующих ключевые ферменты азотфиксации — нитрогеназы (Panpatte et al., 2016). Кроме того, установлено положительное влияние некоторых представителей рода, в частности *P. fluorescens*, на образование клубеньков у бобовых культур (Nagpal et al., 2021). Однако текущие данные о diaзотрофных свойствах *Pseudomonas* ограничены, и сведения о способности других видов рода к фиксации азота в настоящее время в научной литературе практически отсутствуют (Shrivastava et al., 2015).

В связи с этим поиск и характеристика новых азотфиксирующих штаммов *Pseudomonas* представляют значительный интерес как с научной точки зрения (для расширения представлений о физиолого-биохимических особенностях рода), так и с прикладной (для разработки биологических средств повышения доступности азота в агроэкосистемах). Особую актуальность представляет изучение потенциала совместного использования нескольких штаммов *Pseudomonas*, обладающих азотфиксирующей активностью, с целью синергетического повышения эффективности азотного питания растений.

Цель исследования — охарактеризовать азотфиксирующую способность штаммов *Pseudomonas koreensis* и *Pseudomonas plecoglossicida* и оценить перспективы их совместного применения в качестве микробных агентов, способствующих улучшению азотного питания сельскохозяйственных культур.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы

Штаммы бактерий, полученные из Национального биоресурсного центра Всероссийской коллекции промышленных микроорганизмов НИЦ «Курчатовский институт»:

- (1) *Pseudomonas koreensis* В-3481. Штамм получен путем мутагенеза, является антагонистом почвенных патогенов.
- (2) *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802. Штамм выделен из корней авокадо, способен продуцировать сидерофоры.

Оборудование

Шейкер-инкубатор LSI-3016A (Daihan Labtech, Южная Корея) 2012 г. выпуска, Rapid N cube (Rapid, Германия) 2008 г. выпуска, спектрофотометр UV 1800 (Shimadzu, Япония) 2012 г. выпуска, денситометр Densichek plus («BioMerieux», Франция) 2021 г. выпуска, центрифуга 5430 («Eppendorf», Германия) 2012 г. выпуска.

Методы, инструменты и процедура исследования

Способность к фиксации азота

Для анализа способности штаммов фиксировать азот готовили суспензию бактериального штамма в физиологическом растворе с коэффициентом мутности 0,8–1,0 по МакФарланду с использованием денситометра (Faskhutdinova et al., 2024). Затем 1 мл полученной суспензии добавляли в 10 мл питательной среды следующего состава, г/л: 10,0 глюкозы («Chem-ех», Россия); 5,0 магния серноокислого 7-водного («Chem-ех», Россия); 1,0 калия фосфорнокислого 2-замещенного 3-водного («Chem-ех», Россия); 0,005 натрия молибденовокислого 2-водного («ХимРеактив», Россия); 5,0 натрия хлористого («ЛенРеактив», Россия); 0,01 железа II серноокислого 7-водного («ХимРеактив», Россия); 2,0 кальция углекислого («ХимРеактив», Россия). Полученную смесь культивировали в шейкере-инкубаторе в течение 2 сут. при температуре 28–30 °С и скорости 120 об/мин. Далее отделяли культуральную жидкость от клеток центрифугированием в течение 10 мин при скорости 8000 об/мин. Содержание азота в бесклеточной культуральной жидкости определяли с использованием анализатора азота Rapid N Cube.

Способность к продуцированию аммиака

Для этого готовили суспензию бактериального штамма с коэффициентом мутности 0,8–1,0 по МакФарланду (Faskhutdinova et al., 2024) на 1% пептонной воде. К 10 мл 1% пептонной воды добавляли 1 мл полученной суспензии и культивировали в течение 24 ч при температуре 28±2 °С и скорости вращения 110 об/мин. К 3 мл бесклеточной культуральной жидкости (клетки отделяли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при скорости 8000 об/

мин) добавляли 150 мкл реактива Несслера («ЛенРеактив», Россия). Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 450 нм. Оптическую плотность образца определяли по формуле 1:

$$ОП = ОП_э - ОП_к, \quad (1)$$

где ОП — расчетная оптическая плотность образца; ОП_э — экспериментальная оптическая плотность образца; ОП_к — оптическая плотность контрольного варианта.

Количество произведенного аммиака определяли по градуировочному графику стандартного раствора аммония от 50 до 300 мкг/мл.

Оценка биосовместимости бактериальных штаммов

Изучение биосовместимости штаммов методом совместного культивирования. В чашку Петри с агаризованной средой Лурия-Бертани в модификации Миллера ровным слоем с помощью шпателя Дригальского наносили тест-культуру. В лунки диаметром 4 мм вносили культуральную жидкость исследуемого штамма (готовили суспензию бактериального штамма в физиологическом растворе с коэффициентом мутности 0,8–1,0 по МакФарланду с использованием денситометра (Faskhutdinova et al., 2024). Затем 1 мл полученной суспензии добавляли в 10 мл питательной среды Лурия-Бертани в модификации Миллера и культивировали в течение 24 ч при температуре 28 ± 2 °С и скорости вращения 110 об/мин. Далее клетки отделяли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при скорости 8000 об/мин). Культивировали при температуре 28 ± 2 °С в течение 24 ч. Культуры считались биосовместимыми, если не образовывалась зона ингибирования.

Конструирование микробных консорциумов и проверка их активностей

Для конструирования микробных консорциумов готовили бактериальные суспензии исследуемых штаммов по методике, описанной в приготовлении культуральной жидкости без отделения клеток от культуральной жидкости. Далее в стерильную жидкую среду Лурия-Бертани в модификации Миллера вносили определенное количество микроорганизмов в зависимости от соотношения (Таблица 1).

Таблица 1

Соотношение исследуемых бактериальных штаммов в консорциумах

Table 1

Ratio of the Studied Bacterial Strains in Consortia

Номер	Соотношение	
	<i>Pseudomonas koreensis</i> B-3481	<i>Pseudomonas plecoglossicida</i> B-13802
Консорциум № 1	1	1
Консорциум № 2	1	2
Консорциум № 3	2	1
Консорциум № 4	1	3
Консорциум № 5	3	1
Консорциум № 6	2	3
Консорциум № 7	3	2

Консорциумы культивировали в шейкере-инкубаторе в течение 24 ч при температуре 28 ± 2 °C и скорости вращения 110 об/мин. Для получения супернатанта отделяли клетки от культуральной жидкости с помощью центрифугирования в течение 10 мин при скорости 8000 об/мин.

Способность консорциумов к фиксации азота

Анализ способности консорциумов фиксировать азот. Для этого готовили суспензии бактериальных штамма в физиологическом растворе с коэффициентом мутности 0,8–1,0 по МакФарланду с использованием денситометра (Faskhutdinova et al., 2024). Затем вносили определенное количество микроорганизмов в зависимости от соотношения (Таблица 1) в 10 мл питательной среды следующего состава, г/л: 10,0 глюкозы («Chem-ех», Россия); 5,0 магния серноокислого 7-водного («Chem-ех», Россия); 1,0 калия фосфорнокислого 2-замещенного 3-водного («Chem-ех», Россия); 0,005 натрия молибденовокислого 2-водного («ХимРеактив», Россия); 5,0 натрия хлористого («ЛенРеактив», Россия); 0,01 железа II серноокислого 7-водного («ХимРеактив», Россия); 2,0 кальция углекислого («ХимРеактив», Россия). Полученную смесь культивировали в шейкере-инкубаторе в течение 2 сут. при температуре 28–30 °C и скорости 120 об/мин. Далее отделяли культуральную жидкость от клеток центрифугированием в течение 10 мин при скорости 8000 об/мин. Содержание азота в бесклеточной культуральной

жидкости определяли с использованием анализатора азота Rapid N Cube (Серазетдинова и др., 2023).

Способность к продуцированию аммиака

Определение способности к производству аммиака осуществляли по методике, описанной в работе Parashar et al. (2023). Для этого готовили суспензии бактериальных штаммов с коэффициентом мутности 0,8–1,0 по МакФарланду (Faskhutdinova et al., 2024) на 1 % пептонной воде. В 10 мл 1 % пептонной воды вносили определенное количество микроорганизмов в зависимости от соотношения (Таблица 1) и культивировали в течение 24 ч при температуре 28 ± 2 °C и скорости вращения 110 об/мин. К 3 мл бесклеточной культуральной жидкости (клетки отделяли при помощи центрифугирования в течение 10 мин при скорости 8000 об/мин) добавляли 150 мкл реактива Несслера («ЛенРеактив», Россия). Затем измеряли оптическую плотность на спектрофотометре при 450 нм. Оптическую плотность образца определяли по формуле 1.

Лабораторная апробация

Лабораторную апробацию перспективного консорциума и отдельных штаммов проводили с использованием яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. *emend.*) «Сибирский Альянс». Для оценки эффективности штаммов и консорциума семена пшеницы стерилизовали 2,5 % гипохлоритом натрия в течение 3 мин и трижды промывали дистиллированной водой. Далее семена высаживали в растительни в почву (содержание доступных для растений питательных элементов (мг/л), не менее: азота ($\text{NH}_4 + \text{NO}_3$) — 180; фосфора (P_2O_5) — 225; калия (K_2O) — 270; микроэлементов (мг/кг): железо — 0,8; молибден — 0,1; бор — 0,4; цинк — 0,2; марганец — 8; медь — 3. Влажность — не более 65 %, pH — 5,5–6,5) и поливали рабочим раствором штаммов и консорциума в количестве 10 л/т. Рабочий раствор штаммов и консорциума готовили культивированием штаммов/консорциума в жидкой среде Луриа-Бертани в модификации Миллера в течение 24 ч при температуре 28 ± 2 °C и скорости вращения 110 об/мин и разбавлением полученной культуральной жидкости с использованием дистиллированной воды в соотношении 2:8. Семена проращивали в течение 10 суток до фазы проростка по шкале десятичного кода при температуре

25 °C и влажности 50–60%. В качестве контроля использовались стерильные семена, проращиваемые в течение 10 суток и поливаемые стерильной дистиллированной водой.

Для оценки всхожести семян пшеницы использовали формулу 2:

$$B = (N_{\text{пс}} / N_{\text{ос}}) \times 100, \quad (2)$$

где B — всхожесть семян, %;
 $N_{\text{пс}}$ — количество проросших семян, шт;
 $N_{\text{ос}}$ — общее количество семян, шт.

Длины корней и надземной части растений пшеницы измеряли на миллиметровой бумаге с точностью 0,5 мм Faskhutdinova et al. (2024). Количество азота и белка в надземной части растений в фазе проростка по шкале десятичного кода определяли по методу Дюма в соответствии с ГОСТ Р 54390–2011/ISO/TS 16634–2:2009 с использованием анализатора Rapid N Cube.

Статистическая обработка результатов

Все исследования проводили в пятикратной повторности. Полученные значения выражали как среднее значение пяти измерений со стандартным отклонением. Анализ статистических данных осуществляли при помощи программного продукта Microsoft Office Excel 2007 (12.0.6612.1000) SP3 MSO (12.0.6607.1000) (Microsoft corporation, США). Статистический анализ полученных данных проводили с помощью одномоментного парного критерия Стьюдента, по каждой паре интересов. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Для оценки эффективности штаммов рода *Pseudomonas* в качестве биоудобрений, способствующих азотному питанию растений, необходимо провести комплексный анализ их diazотрофной активности. Это включает в себя количественное определение фиксации атмосферного азота и продукции аммиака. Учитывая потенциальные антагонистические взаимодействия между микроорганизмами при совместном культивировании, необходимо исследование биосовместимо-

сти штаммов, а также оценка влияние различных комбинаций штаммов в составе консорциума на их азотфиксирующую активность и аммонификацию. При составление оптимального консорциума необходимо провести лабораторную апробацию на пшеницы в условиях *in vitro* для подтверждения эффективности применения консорциума на основе штаммов рода *Pseudomonas*.

Способность бактериальных штаммов к фиксированию азота и продуцированию аммиака

Результаты исследования способности штаммов рода *Pseudomonas* фиксировать азот и производить аммиак представлены на Рисунке 1.

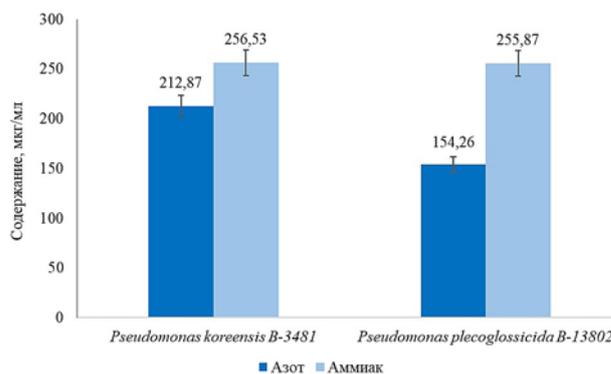
Проведенное исследование выявило способность штаммов *Pseudomonas koreensis* B-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802 фиксировать атмосферный азот и продуцировать аммиак. Полученные результаты представляют значительный интерес для исследователей, поскольку ранее не выявлено доказательств азотфиксирующей активности этих штаммов в научной литературе. Таким образом, полученные результаты расширяют знания о биохимических свойствах *Pseudomonas koreensis* B-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* B-13802, подтверждая разнообразие азотфиксирующей активности бактерий рода *Pseudomonas*.

Рисунок 1

Способность бактериальных штаммов к фиксированию азота и продуцированию аммиака

Figure 1

The Ability of Bacterial Strains to Fix Nitrogen and Produce Ammonia.



Изучение биосовместимости *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802

На следующем этапе исследования проведена оценка биосовместимости штаммов *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802. Результаты анализа показали, что метаболиты *Pseudomonas koreensis* не ингибируют рост *Pseudomonas plecoglossicida* на плотной питательной среде. Метаболиты *Pseudomonas plecoglossicida* также не проявляют антагонических свойств в отношении *Pseudomonas koreensis* (Рисунок 2). Об этом говорит отсутствие зоны ингибирования роста тест-культуры вокруг лунки, содержащей метаболиты исследованного штамма. Полученные данные свидетельствуют о том, что штаммы перспективно использовать в составе консорциума. Это открывает перспективы для создания многокомпонентных микробиологических препаратов на основе этих штаммов, что может повысить эффективность их применения.

Конструирование бактериальных консорциумов и исследование их биологической активности

На следующем этапе исследования были разработаны консорциумы, включающие штаммы *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 в различных соотношениях (Таблица 1).

Для определения оптимального соотношения штаммов в консорциуме, была проведена оценка азотфиксирующей активности каждого варианта (Таблица 2).

Количество азота в культуральной жидкости варьировалось в диапазоне от 129,55 до 289,76 мкг/мл; аммиака — от 198,64 до 344,20 мкг/мл. Наименьшей активностью обладал консорциум № 4. У некоторых других консорциумов наблюдалась сниженная способность фиксировать азота, так у консорциумов № 1 и 2 меньше азота по сравнению со средними значениями по отдельно взятым штаммам на 7,42 и 17,46 мкг/мл соответственно. Также у консорциума № 2 снижена активность по продуцированию аммиака на 24,01 мкг/мл.

Рисунок 2

Биосовместимость исследуемых бактериальных штаммов

Figure 2

Biocompatibility of the Studied Bacterial Strains



Примечание. 1 — метаболиты *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 в отношении *Pseudomonas koreensis* В-3481; 2 — метаболиты *Pseudomonas koreensis* В-3481 в отношении *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802

Note: 1 — metabolites of *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 in relation to *Pseudomonas koreensis* В-3481; 2 — metabolites of *Pseudomonas koreensis* В-3481 in relation to *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802

Таблица 2

Исследование способности консорциумов фиксировать азот и продуцировать аммиак

Table 2

Investigation of the Ability of Consortia to Fix Nitrogen and Produce Ammonia

Консорциум	Показатели			
	Азота, мкг/мл		Аммиака, мкг/мл	
	Значение	Среднее по штаммам	Значение	Среднее по штаммам
Консорциум № 1	176,15 ± 4,89	183,57	259,38 ± 6,53	256,20
Консорциум № 2	156,34 ± 4,56	173,80	232,08 ± 5,28	256,09
Консорциум № 3	289,76 ± 5,20	193,33	344,20 ± 7,06	256,31
Консорциум № 4	129,55 ± 2,34	168,91	198,64 ± 4,23	256,04
Консорциум № 5	209,53 ± 5,09	198,22	278,86 ± 5,64	256,37
Консорциум № 6	188,53 ± 3,87	177,70	264,33 ± 5,07	256,13
Консорциум № 7	251,07 ± 5,61	189,43	302,20 ± 6,31	256,27

Наибольшей активностью обладал консорциум № 3, так содержание азота составило 289,76 мкг/мл, содержание аммиака — 344,20 мкг/мл. Таким образом, для дальнейшего анализа выбран консорциум № 3: *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 в соотношении 2:1.

Лабораторная апробация

Семена яровой мягкой пшеницы (*Triticum aestivum* L. *emend.*) сорта «Сибирский Альянс» были представлены Кемеровским Научно-исследовательским институтом сельского хозяйства — филиалом Сибирского федерального научного центра агробиотехнологий РАН. Варианты обработки представлены в Таблице 3.

Таблица 3

Варианты обработки пшеницы отдельными штаммами и консорциумом

Table 3

Wheat Treatment Options with Individual Strains and Consortium

Варианты обработки	Описание
Контроль	Без обработки
Вариант 1	Обработка <i>Pseudomonas koreensis</i> В-3481
Вариант 2	Обработка <i>Pseudomonas plecoglossicida</i> В-13802
Вариант 3	Обработка консорциумом № 3

В Таблице 4 представлены результаты всхожести семян, длины побегов и корней яровой мягкой пшеницы.

Таблица 4

Оценка всхожести семян, длины побегов и корней яровой мягкой пшеницы

Table 4

The Evaluation of Seed Germination, Shoot Length and Roots of Spring Soft Wheat

Вариант обработки	Показатели		
	Всхожесть, %	Длина ростка, см	Длина корня, см
Контроль	73±1	13,2±0,4	8,4±0,2
Вариант 1	81±2	14,9±0,3	9,4±0,3
Вариант 2	76±3	14,1±0,3	8,9±0,3
Вариант 3	90±4	15,6±0,5	10,1±0,3

Исследование показало, что обработка семян штаммами *Pseudomonas koreensis* В-3481, *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802, а также консорциумом № 3, содержащим оба штамма, привела к улучшению показателей роста пшеницы. Наблюдалось увеличение всхожести семян, а также длины ростка и корня по сравнению с контрольной группой.

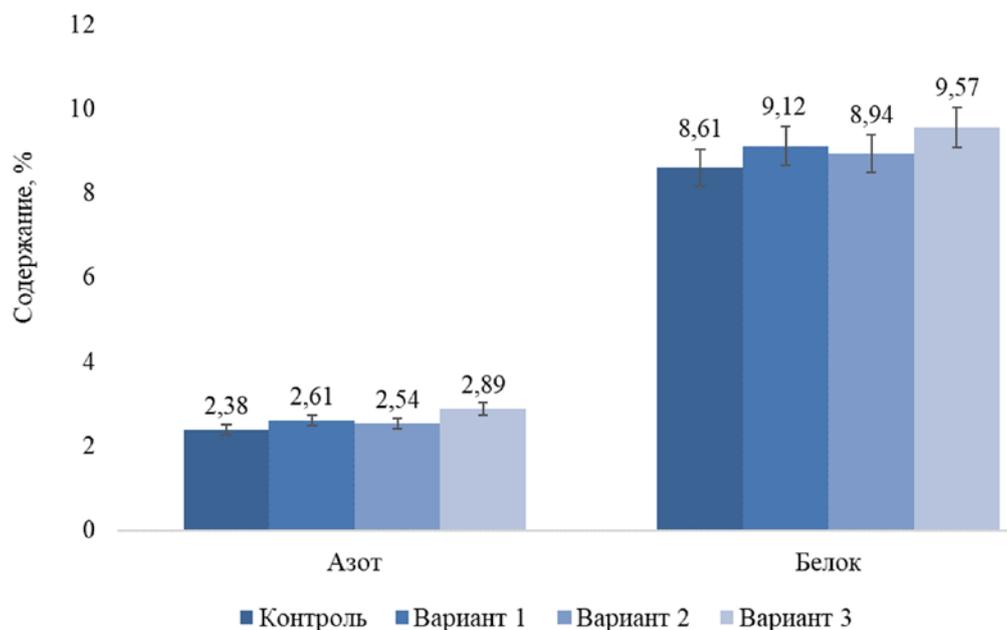
Статистически значимые ростостимулирующие свойства были выявлены при обработке штаммом *Pseudomonas koreensis* В-3481, который увеличил

Рисунок 4

Содержание азота и белка в надземной части в фазе проростка (ДК 10–19) по шкале десятичного кода с планкой погрешности процент

Figure 4

Nitrogen and Protein Content in the Aboveground Part in the Sprout Phase (DK 10–19) According to a Decimal Code Scale with an Error Bar of a Percent



всхожесть на 8% и длину ростка на 1,7 см по сравнению с контролем. Также статистически значимые результаты были получены при обработке консорциумом № 3, который увеличил всхожесть на 17%, длину ростка на 2,4 см и длину корня на 1,7 см по сравнению с контролем.

Так как данные штаммы и консорциумы способны фиксировать азот и продуцировать аммиак, то предположительно при обработки растений данными штаммами/консорциумом количество азота и белка в них должно увеличивается (Завалин & Соколов, 2018). Результаты анализа содержания азота и белка в надземной части представлены на Рисунке 3.

Содержание азота в надземной части пшеницы находилось в диапазоне от 2,38 до 2,89%, содержание белка — от 8,61 до 9,57%. Результаты исследования свидетельствуют о том, что наибольшее влияние на содержание азота и белка в пшенице оказал консорциум (содержание азота увеличилось на 0,51%, белка — на 0,96% в сравнении с контрольным вариантом).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цель настоящего исследования заключалась в характеристике азотфиксирующей способности штаммов *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802, а также в оценке их потенциала для совместного применения с целью улучшения азотного питания растений. Полученные результаты убедительно демонстрируют, что оба штамма обладают способностью к биологической фиксации атмосферного азота, а также продуцируют аммиак в количествах, подтверждающих их функциональную активность как несимбиотических diaзотрофов. Это расширяет представления о физиолого-биохимическом потенциале рода *Pseudomonas* как перспективного источника микроорганизмов для биологизации земледелия.

Несмотря на то, что азотфиксирующая активность бактерий рода *Pseudomonas* уже находила отражение в научной литературе (Завалин и соавт., 2019; Коршунова и соавт., 2021; Panpatte et al., 2016; Nagpal et al., 2021), продукция аммиака, зафиксиро-

роvanная в нашем исследовании, превышает показатели, представленные в ряде ранее опубликованных работ. Это, по-видимому, обусловлено как видоспецифическими особенностями использованных штаммов, так и положительным эффектом их совместного культивирования. Совместное применение *P. koreensis* В-3481 и *P. plecoglossicida* В-13802 в оптимальном соотношении 2:1 позволило достичь наибольших значений продукции азота (289,76 мкг/мл), что на 49,88 % превышает среднее значение для индивидуальных культур. Продукция аммиака составила 344,20 мкг/мл, что на 78,04 % выше среднего по отдельным штаммам, указывая на выраженный синергетический эффект в консорциуме.

Проведённые в лабораторных условиях биотесты продемонстрировали, что оба штамма, как в монокультуре, так и в консорциуме, оказывали стимулирующее воздействие на рост пшеницы, что согласуется с наблюдениями других исследователей. В частности, Yarzabal et al. (2018) зафиксировали положительное влияние штаммов *Pseudomonas*, выделенных из антарктических почв, на ростовые показатели *Triticum aestivum*, включая увеличение длины корней и побегов. Аналогично, Safari et al. (2018) сообщили об улучшении всхожести, массы и солеустойчивости проростков пшеницы при обработке *Pseudomonas fluorescens*.

Тем не менее, влияние бактерий рода *Pseudomonas* на рост растений не является однозначным. В ряде исследований описаны ингибирующие эффекты, связанные, вероятно, с избыточной продукцией фитогормонов. Так, Худайгулов и соавт. (2011) выявили снижение всхожести при высоких концентрациях *Ps. chlororaphis* ИБ-51, что авторы связывают с возможным переизбытком индолил-3-уксусной кислоты. Сходные данные приводят Миннебаев и соавт. (2019), отмечая, что высокая концентрация фитогормонов может оказывать токсическое действие на растения. В нашем исследовании оптимизация соотношения штаммов в консорциуме, вероятно, позволила достичь сбалансированного уровня продукции физиологически активных веществ, обеспечивая стимулирующий, а не ингибирующий эффект. Дополнительно, возможен механизм пролонгированного действия фитогормонов, обусловленный их комплексированием с экзополисахаридами, как показано в работе Веселова и соавт. (1998).

Следует также учитывать видоспецифическую чувствительность растений к бактериальному воздействию. Так, согласно данным Миннебаева и соавт. (2019), эффективность различных штаммов *Pseudomonas* варьировала в зависимости от культуры: высокие эффекты наблюдались у гороха, нута и люпина, в то время как у люцерны и донника они были выражены слабо или отсутствовали. Предполагается, что подобная избирательность может быть связана с наличием в оболочке семян вторичных метаболитов, таких как алкалоиды, к которым *Pseudomonas* менее устойчивы. В нашем исследовании, сфокусированном на пшенице, ингибирующего эффекта зафиксировано не было, что может свидетельствовать о лучшей совместимости штаммов с данной культурой.

Ростостимулирующее действие микроорганизмов обусловлено комплексом механизмов, включая синтез фитогормонов, сидерофоров, растворение фосфатов, выработку антагонистических соединений и, в ряде случаев, фиксацию атмосферного азота (Серазетдинова и соавт., 2023). Поэтому нельзя исключать, что стимулирующее влияние, наблюдаемое в данном исследовании, обусловлено действием нескольких факторов одновременно. Однако зафиксированное повышение содержания общего азота и белка в надземной части растений служит косвенным подтверждением улучшения азотного питания в присутствии исследуемых штаммов. Эти данные согласуются с результатами Fox et al. (2016), показавших, что *P. protegens* Pf-5 X940 повышает содержание азота в зерне пшеницы, а также с результатами Pham et al. (2017), продемонстрировавших, что *P. stutzeri* A15 превосходит по эффективности минеральное удобрение при выращивании риса.

В совокупности представленные результаты позволяют сделать вывод о высоком биотехнологическом потенциале *P. koreensis* и *P. plecoglossicida* как самостоятельных, так и синергетически действующих агентов, способных эффективно повышать биологическую доступность азота и стимулировать рост растений в агроэкосистемах.

Ограничения исследования

Ограничением настоящего исследования является то, что эксперименты проводились *in vitro* и *in planta* в лабораторных условиях на ограниченном коли-

честве образцов. Результаты, полученные в контролируемой среде, могут не полностью отражать реальные полевые условия, где действуют другие факторы, влияющие на рост растений и фиксацию азота (например, конкуренция с другими микроорганизмами, колебания температуры и влажности, наличие других питательных веществ). В связи с этим для понимания роли исследуемых микроорганизмов необходимо дополнительное проведение полевого эксперимента. Также исследование проводили на одном сорте яровой мягкой пшеницы («Сибирский Альянс»). Взаимодействие описанных штаммов с другими сортами пшеницы или другими зерновыми культурами может приводить к другому эффекту.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установление азотфиксирующей активности *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 расширяет представления о биохимическом потенциале представителей *Pseudomonas*, а также обуславливают возможность их применения в сельскохозяйственной практике. Наблюдаемый синергический эффект совместного культивирования этих штаммов, проявляющийся в усилении фиксации атмосферного азота, является основой для разработки инновационных биопрепаратов на основе консорциума *P. koreensis* В-3481 и *P. plecoglossicida* В-13802. Данный подход особенно актуален, поскольку в естественных условиях растения взаимодействуют с комплексными микробными сообществами, а не с изолированными штаммами.

Лабораторные исследования продемонстрировали высокие ростостимулирующие свойства консорциума и его положительное влияние на накопление азота и белка в надземной массе пшеницы. Использование консорциума на основе *Pseudomonas koreensis* В-3481 и *Pseudomonas plecoglossicida* В-13802 может стать важным шагом на пути к созданию устойчивого и экологически безопасного сельского хозяйства. Дальнейшее исследование консорциума будет направлено на оптимизацию его культивирования с целью повышения его эффективности и устойчивости в окружающей среде. Также планируется проведение полевых испытаний для оценки практической применимости консорциума в реальных условиях сельского хозяй-

ства. Кроме того, перспективным направлением является оценка возможности применения данного консорциума для других сельскохозяйственных культур.

АВТОРСКИЙ ВКЛАД

Юлия Ренатовна Серазетдинова: проведение исследования; написание черновика рукописи.

Наталья Николаевна Богачёва: проведение исследования.

Константин Валерьевич Карчин: визуализация.

Ольга Александровна Исачкова: разработка методологии.

Ольга Александровна Неверова: разработка методологии, написание рукописи — рецензирование и редактирование.

Людмила Константиновна Асякина: получение финансирования; разработка концепции, административное руководство исследовательским проектом.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Yuliya R. Serazetdinova: investigation; writing — original draft preparation.

Natalia N. Bogacheva: investigation.

Konstantin V. Karchin: visualization.

Olga A. Isachkova: methodology.

Olga A. Neverova: methodology, writing — review & editing.

Lyudmila K. Asyakina: funding acquisition; conceptualization; project administration.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Болдышева, Е. П., Чудинов, В. А., Попова, В. И., & Бекмагамбетов, А. И. (2020). Применение минеральных удобрений под яровую пшеницу при ресурсосберегающей технологии предельвания на обыкновенном черноземе. *Вестник Омского государственного аграрного университета*, 2(38), 41–51.
- Boldysheva, E. P., Chudinov, V. A., Popova, V. I., & Bekmagambetov, A. I. (2020). Application of mineral fertilizers in resource-saving cultivation technologies of spring wheat on ordinary chernozem. *Bulletin of Omsk State Agrarian University*, 2(38), 41–51. (In Russ.)
- Веселов, С. Ю., Иванова, Т. Н., Симонян, М. В., & Мелентьев, А. И. (1998). Исследование цитокининов, продуцируемых ризосферными микроорганизмами. *Прикладная биохимия и микробиология*, 34(2), 175–179.
- Veselov, S. Yu., Ivanova, T. N., Simonyan, M. V., & Melentyev, A. I. (1998). Study of cytokinins produced by rhizosphere microorganisms. *Applied Biochemistry and Microbiology*, 34(2), 175–179. (In Russ.)
- Завалин, А. А., & Соколов О. А. (2018) Азот и качество зерна пшеницы. *Плодородие*, 1(100), 14–17.
- Zavalin, A. A., & Sokolov, O. A. (2018) Nitrogen and wheat grain quality. *Fertility*, 1(100), 14–17. (In Russ.)
- Завалин, А. А., Алферов, А. А., & Чернова, Л. С. (2019). Ассоциативная азотфиксация и практика применения биопрепаратов в посевах сельскохозяйственных культур. *Агрохимия*, (8), 83–96.
- Zavalin, A. A., Alferov, A. A., & Chernova, L. S. (2019). Associative nitrogen fixation and the practice of application of biological products in agricultural crops. *Agrochemistry*, (8), 83–96. (In Russ.)
- Завалин, А. А., Благовещенская, Г. Г., Шмырева, Н. Я., Чернова, Л. С., Соколов, О. А., Алферов, А. А., & Самойлов, Л. Н. (2015). Современное состояние проблемы азота в мировом земледелии. *Агрохимия*, (5), 83–95.
- Zavalin, A. A., Blagoveshchenskaya, G. G., Shmyreva, N. Ya., Chernova, L. S., Sokolov, O. A., Alferov, A. A., & Samoilo, L. N. (2015). Current state of the problems of nitrogen in world agriculture. *Agrochemistry*, (5), 83–95. (In Russ.)
- Коршунова, Т. Ю., Бакаева, М. Д., Кузина, Е. В., Рафикова, Г. Ф., Четвериков, С. П., Четверикова, Д. В., & Логинов, О. Н. (2021). Роль бактерий рода *Pseudomonas* в устойчивом развитии агросистем и защите окружающей среды (обзор). *Прикладная биохимия и микробиология*, 57(3), 211–227.
- Korshunova, T. Yu., Bakaeva, M. D., Kuzina, E. V., Rafikova, G. F., Chetverikov, S. P., Chetverikova, D. V., & Loginov, O. N. (2021). The role of *Pseudomonas* bacteria in sustainable development of agrosystems and protection of the environment (Review). *Applied biochemistry and microbiology*, 57(3), 211–227. (In Russ.)
- Кудеяров, В. Н., & Семенов В. М. (2014). Проблемы агрохимии и современное состояние химизации сельскохозяйственного производства в Российской Федерации. *Агрохимия*, (10), 3–17.
- Kudeyarov, V. N., & Semenov V. M. (2014). Agrochemical problems and the current state of agricultural chemicalization in the russian federation. *Agrochemistry*, (10), 3–17. (In Russ.)
- Миннебаев, Л. Ф., Кузина, Е. В., Рафикова, Г. Ф., Чанышев, И. О., & Логинов, О. Н. (2019). Продуктивность бобово-ризобияльного комплекса под влиянием ростстимулирующих штаммов микроорганизмов. *Сельскохозяйственная биология*, 54(3), 481–493.
- Minnebaev, L. F., Kuzina, E. V., Rafikova, G. F., Chanyshv, I. O., & Loginov, O. N. (2019). Productivity of the legume-rhizobial complex under the influence of growth-stimulating strains of microorganisms. *Agricultural Biology*, 54(3), 481–493. (In Russ.)
- Прянишников, Д. Н. (1927). Собрание статей и научных работ: монография (том 1). Москва: Работник просвещения.
- Pryanishnikov, D. N. (1927). Collection of articles and scientific works: monograph (volume 1). Moscow: Education worker. (In Russ.)
- Романова, И. Н., Князева, С. М., Глушаков, С. Н., Терентьев, С. Е., & Перепичай, М. И. (2016). Урожайность зерновых культур и уровень плодородия почвы в зависимости от внесения

- минеральных удобрений, типа почв в системе севооборота. *Зерновое хозяйство России*, (2), 57–61.
- Romanova, I. N., Knyazeva, S. M., Glushakov, S. N., Terentiev, S. E., & Perepichay, M. I. (2016). Productivity of grain crops and soil fertility depending on fertilizers, type of soil in the system of crop rotation. *Grain Economy of Russia*, (2), 57–61. (In Russ.)
- Серазетдинова, Ю. Р., Фотина, Н. В., Асякина, Л. К., Милентьева, И. С., Просеков, А. Ю. (2023). Ризобактерии *Triticum* spp. для снижения биотического стресса, вызванного фитопатогенными грибами. *Хранение и переработка сельхозсырья*, (4), 98–113. <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.4.515>
- Serazetdinova, Y. R., Fotina, N. V., Asyakina, L. K., Milentyeva, I. S., & Prosekov, A. Y. (2023). Rhizobacteria for reducing biotic stress in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) caused by phytopathogenic fungi. *Storage and Processing of Farm Products*, (4), 98–113. (In Russ.) <https://doi.org/10.36107/spfp.2023.4.515>
- Соколов, М. С., Глинушкин, А. П., Спиридонов, Ю. Я., Торопова, Е. Ю., & Филипчук, О. Д. (2019). Технологические особенности почвозащитного ресурсосберегающего земледелия (в развитие концепции ФАО). *Агрохимия*, (5), 3–20.
- Sokolov, M. S., Glinushkin, A. P., Spiridonov, Yu. Ya., Toropova, E. Yu., & Filipchuk, O. D. (2019). Technological features of soil-protecting resource-saving agriculture (in development of the FAO concept). *Agrochemistry*, (5), 3–20. (In Russ.)
- Тихонович, И. А., & Завалин А. А. (2016). Перспективы использования азотфиксирующих и фитостимулирующих микроорганизмов для повышения эффективности агропромышленного комплекса и улучшения агроэкологической ситуации в РФ. *Плодородие*, 5(92), 28–32.
- Tikhonovich, I. A., Zavalin A. A. (2016). Prospects for the use of nitrogen-fixing and phytostimulating microorganisms to increase the efficiency of the agro-industrial complex and improve the agro-ecological situation in the Russian Federation. *Fertility*, 5(92), 28–32. (In Russ.)
- Трапезников, В. К., Иванов, И. И., & Тальвинская, Н. Г. (1999). Локальное питание растений. Уфа: Гилем.
- Trapeznikov, V. K., Ivanov, I. I., & Talvinskaya, N. G. (1999). Local nutrition of plants. Ufa: Gilem. (In Russ.)
- Худайгулов, Г. Г., Логинов, О. Н., & Мелентьев, А. И. (2011). Экзополисахарид альгинатного типа *Paenibacillus ehimensis* 739. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*, 5, 214–217.
- Khudaigulov, G. G., Loginov, O. N., & Melentyev, A. I. (2011). Alginate of *Paenibacillus ehimensis* 739. *Bulletin of the Samara Scientific Center of the Russian Academy of Sciences*, 5, 214–217.
- Ahmed, M., Rauf, M., Akhtar, M., Mukhtar, Z., & Saeed, N. A. (2020). Hazards of nitrogen fertilizers and ways to reduce nitrate accumulation in crop plants. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 17661–17670. <https://doi.org/10.1007/s11356-020-08236-y>
- Asyakina, L. K., Vorob'eva, E. E., Proskuryakova, L. A., & Zharko, M. Yu. Evaluating extremophilic microorganisms in industrial regions. *Foods and Raw Materials*, 11(1), 162–171. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2023-1-556>
- Chandra, D., Srivastava, R., Glick, B., & Sharma, A. (2018). Drought-tolerant *Pseudomonas* spp. improve the growth performance of finger millet (*Eleusine coracana* (L.) Gaertn.) under non-stressed and drought-stressed conditions. *Pedosphere*, 28, 227–240. [https://doi.org/10.1016/S1002-0160\(18\)60013-X](https://doi.org/10.1016/S1002-0160(18)60013-X)
- Crawford, N. M., & Glass, A. D. M. (1998). Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in Plants Science*, 3(10), 389–395. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(98\)01311-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(98)01311-9)
- Fageria, N. K., & Baligar, V. C. (2005). Enhancing nitrogen use efficiency in crop plants. *Advances in Agronomy*, 88, 97–185. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(05\)88004-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(05)88004-6)
- Faskhutdinova, E. R., Fotina, N. V., Neverova, O. A., Golubtsova, Y. V., Mudgal, G., Asyakina, L. K., & Aksenova, L. M. (2024). Extremophilic bacteria as biofertilizer for agricultural wheat. *Foods and Raw Materials*, 12(2), 348–360. <https://doi.org/10.21603/2308-4057-2024-2-613>
- Fox, A. R., Soto, G., Valverde, C., Russo, D., Lagares, A. Jr., Zorreguieta, Á., Alleva, K., Pascuan, C., Frare, R., Mercado-Blanco, J., Dixon, R., & Ayub, N. D. (2016). Major cereal crops benefit

- from biological nitrogen fixation when inoculated with the nitrogen-fixing bacterium *Pseudomonas protegens* Pf-5 X940. *Environmental Microbiology*, 18(10), 3522–3534. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13376>.
- Khan, M. N., Mobin, M., Abbas, Z. K., Alamri, S. A. (2020). Fertilizers and Their contaminants in soils, surface and groundwater. *Encyclopedia of the Anthropocene*, 5, 225–240. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809665-9.09888-8>
- Kishorekumar, R., Bulle, M., Wany, A., & Gupta K. J. (2019). An overview of important enzymes involved in nitrogen assimilation of plants. *Nitrogen Metabolism in Plants*, 2057, 1–13. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9790-9_1
- Krapp, A. (2015). Plant nitrogen assimilation and its regulation: a complex puzzle with missing pieces. *Current Opinion in Plant Biology*, 25, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2015.05.010>
- Nagpal, S., Sharma, P., Sirari, A., Kumawat, K. C., Wati, L., Gupta, S. C., & Mandahal, K. S. (2021). Chickpea (*Cicer arietinum* L.) as model legume for decoding the co-existence of *Pseudomonas fluorescens* and *Mesorhizobium* sp. as bio-fertilizer under diverse agro-climatic zones. *Microbiological Research*, 247, 126720. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126720>
- O'Brien, J. A., Vega, A., Bouguyon, E., Krouk, G., Gojon, A., Coruzzi, G., & Gutiérrez, R. A. (2016). Nitrate transport, sensing, and responses in plants. *Molecular Plant*, 9(2), 837–856. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.05.004>
- Panpatte, D.G., Jhala, Y.K., Shelat, H.N., & Vyas, R.V. (2016). *Pseudomonas fluorescens*: A promising biocontrol agent and PGPR for sustainable agriculture. In D. Singh, H. Singh, & R.Prabha (Eds.), *Microbial inoculants in sustainable agricultural productivity*. Springer. https://doi.org/10.1007/978-81-322-2647-5_15
- Parashar, M., Dhar, S. K., Kaur, J., Chauhan, A., Tamang, J., Singh, G. B., Asyakina, L., Perveen, K., Khan, F., Bukhari, N.A., Mudgal, G., & Gururani, M.A. (2023). Two novel plant-growth-promoting *Lelliottia amnigena* isolates from *Euphorbia prostrata* aiton enhance the overall productivity of wheat and tomato. *Plants*, 12, 3081. <https://doi.org/10.3390/plants12173081>
- Pham, V. T., Rediers, H., Ghequire, M. G., Nguyen, H. H., De Mot, R., Vanderleyden, J., & Spaepen, S. (2017). The plant growth-promoting effect of the nitrogen-fixing endophyte *Pseudomonas stutzeri* A15. *Archives of Microbiology*, 199(3), 513–517. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1332-3>
- Rafiq, M., Saqib, M., Jawad, H., Javed, T., Hussain, S., Arif, M., Ali, B., Bazmi, M. S. A., Abbas, G., Aziz, M., Al-Sadoon, M. K., Gulnaz, A., Lamlo, S. F., Sabir, M.A., & Akhtar, J. (2020). Improving quantitative and qualitative characteristics of wheat (*Triticum aestivum* L.) through nitrogen application under semiarid conditions. *Phyton-international Journal of Experimental Botany*, 92(4), 1001–1017. <https://doi.org/10.32604/phyton.2023.025781>
- Safari, D., Jamali, F., Nooryazdan, H., & Bayat, F. (2018) Evaluation of ACC deaminase producing “*Pseudomonas fluorescens*” strains for their effects on seed germination and early growth of wheat under salt stress. *Australian Journal of Crop Science*, 12(3), 413–421. <https://doi.org/10.21475/ajcs.18.12.03.pne801>
- Shrivastava, S., Egamberdieva, D., & Varma, A. (2015). Plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants: the state of the art. In D. Egamberdieva, S. Shrivastava, & A. Varma (Eds.), *Plant-growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and medicinal plants*. *Soil Biology*, 42. Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-13401-7_1
- Singh, P., Singh, R. K., Li, H. B., Guo, D. J., Sharma, A., Verma, K. K., Solanki, M. K., Upadhyay, S. K., Lakshmanan, P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2020). Nitrogen fixation and phytohormone stimulation of sugarcane plant through plant growth promoting diazotrophic *Pseudomonas*. *Biotechnology and Genetic Engineering Review*, 40(1), 1–21. <https://doi.org/10.1080/02648725.2023.2177814>
- Singh, R. K., Singh, P., Sharma, A., Guo, D. J., Upadhyay, S. K., Song, Q. Q., Verma, K. K., Li, D. P., Malviya, M. K., Song, X. P., Yang, L. T., & Li, Y. R. (2022). Unraveling nitrogen fixing potential of endophytic diazotrophs of different *Saccharum* species for sustainable sugarcane growth. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(11), 6242. <https://doi.org/10.3390/ijms23116242>
- Temple, S. J., Vance, C. P., & Gantt, J. S. (1998). Glutamate synthase and nitrogen assimilation. *Trends in Plants Science*, 3(2), 51–56. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01159-X](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01159-X)
- Yarzabal, L. A., Monserrate, L., Buela, L., & Chica, E. (2018). Antarctic *Pseudomonas* spp. promote wheat germination and growth at low temperatures. *Polar Biology*, 41, 2343–2354. <https://doi.org/10.1007/s00300-018-2374-6>